苯和环磷酰胺诱发小鼠肝、骨髓和精原细胞染色体畸变的比较分析*

贺维顺 刘爱华 施立明
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

在同一个体小鼠上比较分析苯和环磷酰胺诱发的肝、骨髓和精原细胞的染色体畸变率。结果表明，这三种靶细胞的遗传毒理学敏感性是不同的。按每只0.01毫升的剂量皮下注射两次苯于部分肝切除的小鼠，按其诱发的染色体畸变率，敏感性的次序是肝＞骨髓＞精原细胞。而以环磷酰胺处理的小鼠(15微克/每克体重，腹腔注射)，诱发的染色体畸变是骨髓＞肝＞精原细胞。苯和环磷酰胺诱发的染色体畸变类型无明显差别，主要都是染色单体型的畸变。这种在同一个体小鼠上比较分析三种靶细胞染色体畸变的方法，对于需要肝代谢活化的前致癌剂／前诱变剂活性的测定以及体内比较三种靶细胞的遗传毒性敏感性提供了新的检测途径。

不同组织、器官对化学诱变剂敏感性的差异及其机制的研究，在遗传毒理学中是一项重要的研究课题。

本文试图以苯和环磷酰胺作为检测剂，以同一个体上的肝、骨髓、精原细胞为靶细胞，比较分析诱发的染色体畸变率差异以期对遗传毒理学敏感性有较好的了解。

材 料 和 方 法

实验程序

1.肝部分切除，按 Schreck 等(1979)方法修改如下：采用本所饲养场提供的雄性小鼠，体重24—25克，乙醚轻度麻醉后，在动物腹部(剑突下)先去毛（约1.5平方厘米大小)，然后沿中线作长约0.7厘米的切口，从侧面轻施压力，使肝脏中叶和左叶突出，用消过毒的缝合线在上述肝叶基部结扎，然后剪去部分肝叶，以小型订书机封闭伤口，

* 秦长庚；保海仙同志参加了部分工作。
本文1983年3月10日收到。

通常经过这种肝部分切除术的小鼠（一周内）活存率仍可达90%以上。

2.给药，在施行手术后24小时，皮下注射苯（C_6H_6，北京化工厂出品，分析纯，批号73074），剂量为0.01毫升/只。共给药两次，间隔时间为24小时，在第二次给药后3小时，按4毫克/公斤剂量腹腔注射秋水仙素，再过3小时，处死小鼠取出肝、骨髓、睾丸。在环磷酰胺处理组，手术后24小时，按15微克/克体重剂量，腹腔注射环磷酰胺（上海第十二制药厂出品，批号810318），然后同苯处理组一样。对于对照组只做部分肝切除，未做其他处理。腹腔注射秋水仙素后再取材。

染色体标本的制备

1.再生肝细胞的染色体标本制备，参考 M. K. Conner 等人（1978）的工作并作适当的改进：在预热至37°C的Hanks溶液中洗去肝组织外表的血污，切去有明显坏死的部分，剪成小块，用机械的方法充分研碎，制成细胞悬浮液并移入离心管，1500转/分离心，沉淀的细胞团用0.4% KCt 室温下低渗45分钟，常规甲醇：冰醋酸（3：1）固定两次，空气干燥法制片。

2.睾丸染色体标本的制备，按照我们实验室常用的方法，在 Hanks 溶液中洗去睾丸外面的血污，除去被膜，在0.7%柠檬酸钠溶液中轻轻使精小管分散，室温下低渗20—30分钟，然后弃去低渗液，以甲醇：冰醋酸（3：1）固定15分钟，更换一次。这时可长期保存于冰箱（最好低于零度）备用，或按下列方法制片。取出部分精小管，剪碎，加入少量60%醋酸，用微吸管轻轻搅动，在几分钟内精小管即开始软化，呈半透明状。这时可按上述体积的60%醋酸一份，加甲醇三份，混均后离心，再以新鲜甲醇：冰醋酸（3：1）固定，空气干燥法制片。

3.骨髓细胞染色体标本的制备，按我们实验室常规方法，0.4%KCt 低渗，甲醇：冰醋酸（3：1）固定，空气干燥法制片。

制成的染色体标本，以磷酸盐缓冲液(pH6.8)稀释的Giemsa(10：1)染色，镜检。

结　果

从表1的实验结果可以看出，三只对照组小鼠的肝、骨髓、精原细胞的染色体自发畸变率都比较低，分别为1.04%，0.82%和0%。畸变类型都属于染色单体型断裂。四只经环磷酰胺处理的小鼠（15微克/克）三种细胞的染色体畸变率都明显增高，分别达到8.46%，9.75%和1.75%。和对照组相比，除了精原细胞以外，这种差异都达到统计学上显著性水平，在三种细胞之间诱发的染色体畸变率也明显不同。以骨髓最为敏感，再生肝次之，精原细胞较不敏感。

三只给苯处理的小鼠，其肝、骨髓、精原细胞的染色体畸变率也都明显增高，分别达12.40%，7.10%和3.72%，和对照相比，都达到统计学上显著性水平。和环磷酰胺处理组不同的是以肝细胞最为敏感，骨髓次之，精原细胞又次之。

苯和环磷酰胺主要诱发染色单体型畸变，最常见的为染色单体断裂和等染色单体断裂，偶见单体互换和染色体环，有时还可见一个细胞内有多发性染色体畸变等染色体损伤（见图版）。

表 1　苯和环磷酰胺诱发小鼠再生肝、骨髓和精原细胞的染色体畸变

处理	细胞	供试动物数	观察细胞数	畸变类型 染色单体断裂	等染色单体断裂	环形染色体	多发性染色体畸变*	染色单体互换	畸变细胞数	畸变细胞率(%)
对照组	肝细胞	3	288	3					3	1.04
	骨髓细胞	3	245	2					2	0.82
	精原细胞	3	300						0	0
环磷酰胺	肝细胞	4	402	26	5	1	2		34	8.46
	骨髓细胞	4	400	20	12	2	4	1	39	9.75
	精原细胞	4	400	5	2				7	1.75
苯	肝细胞	3	225	21	2		5		28	12.40
	骨髓细胞	3	324	22	1				23	7.10
	精原细胞	3	242	7			2		9	3.72

* 多发性染色体畸变指同一个细胞内出现三个或三个以上的畸变

讨　论

在众多的体内药物代谢系统中，肝是主要的器官，许多无毒的药物经肝活化，转化为有毒的，包括有诱变和致癌作用的代谢产物。另一方面，在整体动物的遗传毒理测定中，我们常常以骨髓，外周血淋巴细胞或生殖细胞作为检测药物诱变活性的靶细胞，但是在某些场合，由于待测药物或其代谢产物到达靶细胞的浓度过低，或待测药物或其代谢产物在活体内存在时间过短因而不足以在靶细胞内产生显著的细胞遗传学效应。这样，上述靶细胞对待测药物就可呈阴性反应，所以直接研究药物对肝细胞的诱变效应，即把肝细胞作为遗传毒理测定的靶细胞，无疑是很有意义的（Tates 等，1980）。由于在通常的情况下，成年哺乳动物的肝细胞不进行分裂，因此需给以特殊处理来刺激肝细胞分裂，才能进行染色体分析。目前常用的方法一是注射肝毒物如四氯化碳，使肝组织损伤，然后复原，细胞进行分裂，二是做肝部分切除术，利用肝再生时的分裂细胞做染色体分析，由于显而易见的原因，在遗传毒理学测定中，用注射毒物来刺激肝细胞分裂的方法是不适用的，以我们工作中的体会，肝部分切除术是简易可行的，也是比较安全的技术，只是分裂细胞比率尚比不上骨髓，如何提高肝细胞的有丝分裂活性，在方法学上有待进一步改进。

在遗传毒理学测定中，系统的比较研究不同组织，器官，特别是体细胞和生殖细胞的敏感性，对于全面估价各种化合物的遗传危害是很重要的。近年来有许多工作是以同一个体的小鼠来比较分析骨髓和生殖细胞（Shiraishi，1978），肝和骨髓细胞（Schreck等，1979），骨髓和唾液腺细胞（Ramerez，1980）的遗传毒理敏感性并已得到许多有意义的结果。我们则在同一个体小鼠上，比较分析三种细胞（肝、骨髓和精原细胞）的遗传毒理敏感性。初步结果表明，敏感性的差异是明显的，而且对于不同的药物，敏感性的

顺序也是不同的。看来，这可能反映了不同组织细胞的生物学特性的差异，但最大的可能是和药物在体内的代谢路线，速度以及药物分布有关。给以同一剂量后不同的时间，到达各种器官药物的或其代谢产物的实际浓度不同，因而导致遗传效应的差异。

总之，我们的初步结果表明，在同一个体上比较三种重要的器官细胞的遗传毒理敏感性其方法是可行的。当然，如能采用多种评价指标，结合多次取样，系统地追踪观察给药后不同时间，不同组织器官遗传毒理学效应的动态变化，那就更有意义了。

参 考 文 献

Conner, M. K. et al. 1978 Comparisons of in vivo BrdU labeling mothods and spontaneous sister-chromatid exchange frequencies in regenerating murine liver and marrow cells. *Chromosoma* 68(4):303—311.

Ramerez, P. M. 1980 Analysis in vivo of sister-chromatid exchange in mouse bone-marrow and salivary gland cells. *Mutation Res.* 74(1):61—69.

Schreck, R. R., et al. 1979 In vivo induction of sister-chromatid exchanges in liver and marrow cells by drugs requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 64(5):315—328.

Tates, A. D., et al. 1980 A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mutation Res.* 74(1):11—20.

Yukimasa Shiraishi 1978 Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice *Mutation Res.* 57(3):313—324.

IN VIVO INDUCTION OF CHROMOSOMAL ABERRATION IN LIVER, BONE-MARROW AND SPERMATOGONIAL CELLS IN MICE BY BENZENE AND CYCLOPHOSPHAMIDE

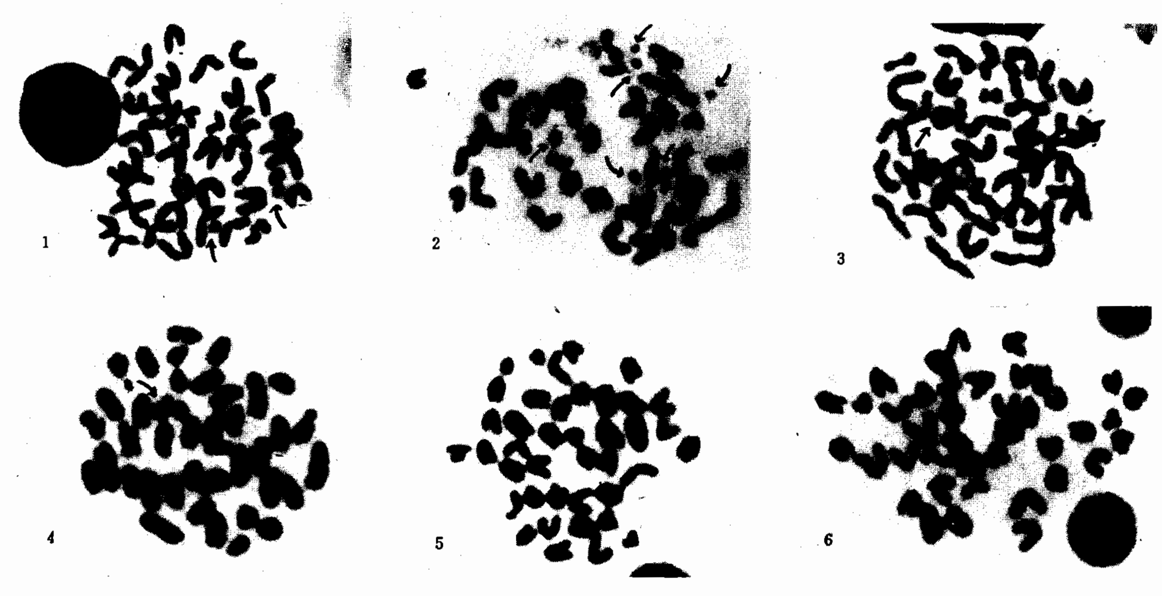
He Weishun Liu Aihua Shi Liming

(Department of Cytogenetics, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

A highly dependable method for the detection of in vivo induction of chromosomal aberration has been developed in liver, bone-marrow and spermatogonial cells in mice subjected to partial hepatectomy. The inductivities of chromosomal aberrations by benzene and cyclophosphamide are different. When the partially hepatectomized mice were injected intraparitoneally with freshly prepared cyclophosphamide solution (15μg/g body wt.), the inductivity to the three target cells is bone-marrow cells>regenerating liver cells>spermatogonial cells, whereas the inductivity of benzene (0.01 ml/mouse, 2 subcutaneous injections) is regenerating liver cells>bone-marrow cells>spermatogonial cells. To develop this procedure will facilitate the detection of drug-induced clastogenic activity, particularly those requiring tissue-specific metabolic activated procarcinogens/promutagens and in vivo comparison of clastogenic sensitivity among the three types of tissues.

贺维顺等：苯和环磷酰胺诱发小鼠肝，骨髓和精原细胞染色体畸变的比较分析

He Weishun et al.: In Vivo Induction of Chromosomal Aberration in Liver, Bone-Marrow and Spermatogonial Cells in Mice by Benzene and Cyclophosphamide



1.环磷酰胺诱发小鼠体内肝细胞的染色单体断片。
2.环磷酰胺诱发小鼠体内肝细胞的多发性染色体畸变。
3.环磷酰胺诱发小鼠体内肝细胞的环形染色体。
4.环磷酰胺诱发小鼠体内骨髓细胞的染色单体互换。
5.正常小鼠精原细胞染色体。
6.正常小鼠肝细胞染色体。

瞿逢伊：人体纹皮蝇二龄幼虫的鉴别特征

Qu Fengyi et al.: Diagnostic Characters of the Second Instar Larva of Hypoderma Lineatum(de Villers) from Human

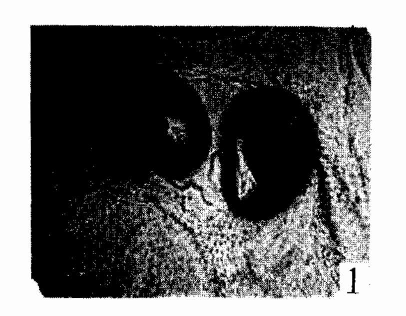




图1—2 纹皮蝇*Hypoderma lineatum* (De Villers)二龄幼虫
1.后气门；2.整体腹面观。